

1 Einleitung

1.1 Gentherapie

Es kann behauptet werden, dass fast alle Krankheiten eine Ursache in der genetischen Ausstattung der erkrankten Zelle oder des erkrankten Organismus haben. Evident ist dies für die, allerdings aus evolutionären Gründen sehr seltenen, „echten“ hereditären Defekte, wie die β -Thalassämien oder die Glycolipidspeicherkrankheiten, wo die mangelnde oder fehlerhafte Expression eines Gens zur manifesten Erkrankung führt. Aber auch viele erst im späteren Leben spontan auftretende oder im Zusammenhang mit Infektionen oder besonderen Lebensumständen „erworbene“ Krankheiten haben eine genetische Komponente insofern, als dass die Ausstattung des Patienten mit bestimmten genetischen Merkmalen die statistische Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Erkrankung erheblich mitbeeinflusst. Ein Beispiel ist die vermehrte Inzidenz von Typ 1-Diabetes im Zusammenhang mit bestimmten Klasse-II HLA-Allelen (Todd, Fukui et al. 1990; Noble, Valdes et al. 2000). Im weitesten Sinne ist auch die Reaktion des Patienten, oder deren Ausbleiben, auf das Entstehen von Tumoren oder eine Infektion mit pathogenen Erregern eine Konsequenz aus dem Wechselspiel zwischen der körpereigenen und einer „fremden“ genetischen Information. Zusammenfassend können diese menschlichen Erkrankungen unter genetischen Gesichtspunkten in drei große Gruppen eingeteilt werden.

1. Monogenetische Erkrankungen wie die oben erwähnten hereditären Defekte hervorgerufen durch einzelne Gendefekte, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden.
2. Komplexe genetische Erkrankungen, die durch eine Reihe von Mutationen unterschiedlicher Gene hervorgerufen, von denen einige noch nicht identifiziert wurden. Dazu gehören die meisten Tumorerkrankungen, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Bluthochdruck, Arthritis, Diabetes und andere Erkrankungen.
3. Erworbene genetische Defekte wie alle Infektionen, genauso wie einige Krebserkrankungen, die einhergehen mit genetischen Veränderungen, die

erworben und zufällig angesammelt wurden (Friedmann 1989; Anderson 1992; Gutierrez, Lemoine et al. 1992; Miller 1992)

Folgt man dieser Sichtweise, so liegt es nahe, auch für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen genetische Information zu gebrauchen. Während die bisherige moderne Pharmazie sich vor allem solcher Stoffe bediente, die mehr oder weniger selektiv in den Stoffwechsel eingriffen, also in die informativ der DNA "nachgelagerte" Komplexitätsebene, eröffnen sich mit dem wachsenden Wissen an Erkenntnissen zur molekularen Steuerung der Zelle auch immer mehr Möglichkeiten, therapeutische Konzepte direkt an der Quelle des Informationsflusses, am Gen selbst, anzusetzen.

Basierend auf der oben genannten Einteilung der Erkrankungen können solche Konzepte in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen kann die Expression der vorhandenen genetischen Information durch gezielten Eingriff beeinflusst werden, etwa durch die sequenzspezifische Zerstörung bestimmter mRNAs mit komplementären oder "antisense" Nukleinsäuren (von Weizsacker, Wieland et al. 1997), Ribozymen (Thompson, Macejak et al. 1995; von Weizsacker, Wieland et al. 1997; Zhang, Xu et al. 1999), DNAsymen (Ota, Warashina et al. 1998; Cairns, Hopkins et al. 1999; Zhang, Xu et al. 1999; Toyoda, Imamura et al. 2000) oder RNAi (Brummelkamp, Bernards et al. 2002). Ein ehrgeizigerer Ansatz, kolloquial und in vielen Fällen mißverständlich mit "Gentherapie" apostrophiert, bemüht sich zum anderen um die gezielte Einführung von genetischer Information in Zellen, die dort gänzlich fehlende oder fehlerhaft exprimierte Gene substituieren soll. Im folgenden soll darunter nur die sogenannte "Somatische Gentherapie" verstanden werden, die Gentransfer nur auf Zellen beschränkt, die nicht Erbinformation in der Keimbahn an nachfolgende Generationen weitergibt. Die somatische Gentherapie kann in zwei methodisch unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden: *ex vivo* und *in vivo* Gentherapie (Abbildung 1.1). *Ex vivo* Gentherapie beinhaltet die Transfektion des therapeutischen Gens in die Zielzellen ausserhalb des Organismus. Typischerweise werden die Zielzellen dem Patienten entnommen (z.B. Tumorzellen oder hämatopoietische Stammzellen). Diese Zielzellen werden dann *in vitro* mit dem therapeutischen Gen transfiziert und dem Patienten zurückgegeben. Im Gegensatz dazu wird bei der *in vivo* Gentherapie die therapeutische genetische Information direkt in den Patienten injiziert. Dabei nutzt man virale oder nicht-virale Methoden (Behr, Demeneix et al. 1989; Jolly 1994; Blau and Springer 1995; Boussif,

Lezoualc'h et al. 1995; Ledley 1995; Kumar and Sercarz 1996; McDonnell and Askari 1996).

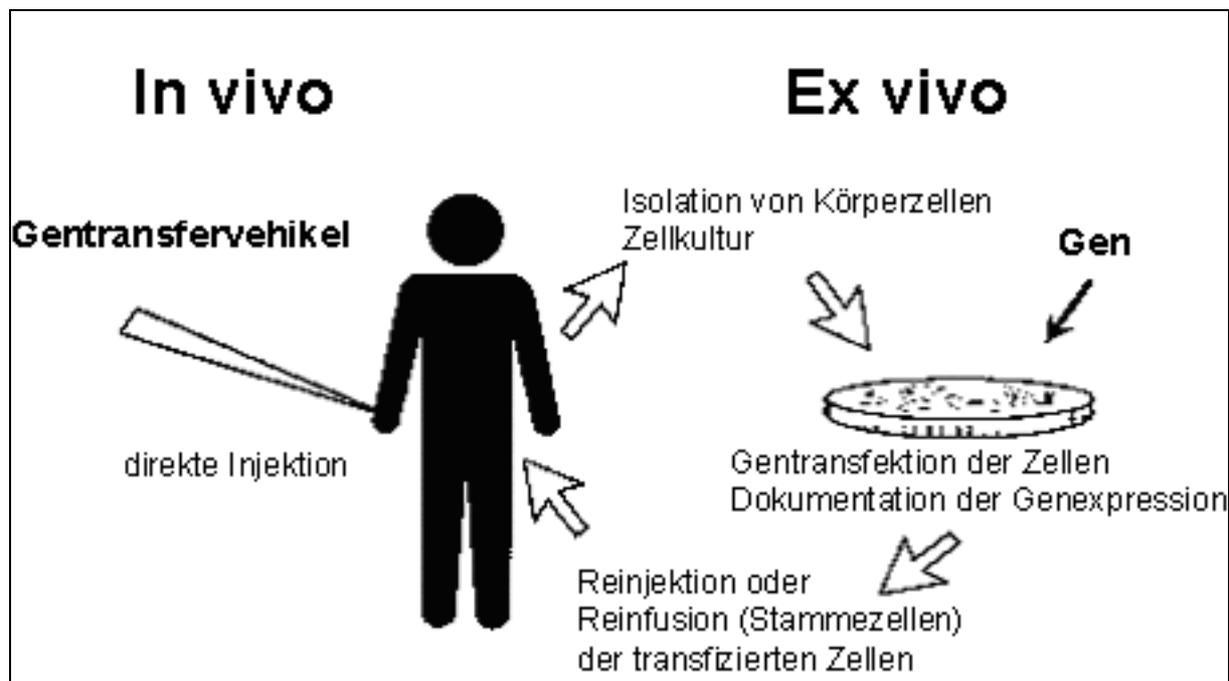


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung von *in vivo* und *ex vivo* Gentherapie

1.1.1 Gentransfer als zentrales Problem der Gentherapie

Mit der exponentiell wachsenden Datenmenge an genetischer Information, die mit den Bemühungen der verschiedenen Genomsequenz-Initiativen gewonnen wird, gibt es keinen Mangel an vielversprechenden Konzepten zum Einsatz von Genen in der Medizin. So findet man in der Literaturdatenbank Medline 1990 217 Titel zum Index-Term "Gene therapy", 1995 bereits 1243 und 1999 1942. Diese Fülle an originellen Ideen hat bisher jedoch nicht zum erhofften massenhaften klinischen Einsatz von Genen in der Medizin geführt. Das zentrale, bisher ungelöste Problem der Gentherapie ist der Mangel an effizienten Methoden zum Einbringen von Genen in die Zielzellen des Empfängerorganismus. Daneben bestimmen Sicherheitsbedenken gegenüber den möglichen Nebenwirkungen, entweder der transferierten Gene oder der DNA an sich, eine wichtige Rolle in der Diskussion.

Meine Arbeit beschreibt eine neue Art, gentransferierte ("transfizierte") Zellpopulationen herzustellen, die sowohl für die medizinische Anwendung als auch für die Forschung von erheblichem Interesse sind. Es handelt sich um das ballistomagnetische Vektorsystem. Im weiteren sollen kurz die konkreten Probleme des Gentransfers und einige der heute verwendeten Lösungen skizziert werden,

dann sollen die Grundlagen der verwendeten Mess-Systeme dargestellt werden und schließlich das Ballistomagnetische Vektorsystem charakterisiert und einige seiner experimentellen Anwendungen dargestellt werden.

1.1.2 Immunotherapie onkologischer Erkrankungen als Beispiel

Es sei anhand eines klinischen Beispiels die Zahl und Hierarchie der Schwierigkeiten erläutert. Eines der wichtigsten ungelösten medizinischen Probleme ist die dauerhaft heilende Behandlung von Tumorerkrankungen, die in die Phase der Fernmetastasierung fortgeschritten sind. Ein vielversprechender Ansatz ist in diesem Zusammenhang, das Immunsystem des Patienten für die Eliminierung des Tumors zu rekrutieren. Es ist schon lange bekannt, dass im Falle einiger Tumore in seltenen Fällen die zufällige oder bewusste Infektion des Tumors mit Bakterien, oder das Auslösen einer starken Reaktion gegen Bakterienlysate, die eine Infektion vortäuschen, dazu führt, dass sich die entstehende antibakterielle Immunreaktion gegen den Tumor zu richten beginnt und schließlich sowohl den infizierten Tumor als auch etwaige Tochtergeschwülste vernichtet (Sadler and Castro 1976; Yuhas and Ullrich 1976; Pavelic, Dave et al. 1980; Tanio, Yamamura et al. 1981). Letztlich kann die Reaktion gegen den Tumor als Induktion einer - für den Patienten vorteilhaften - Autoimmunreaktion begriffen werden. Mit der Aufklärung der an dieser Immunreaktion beteiligten Signalstoffe, der Zytokine, begann eine intensive Suche nach Protokollen, die die beobachtete Antitumorreaktion durch Applikation von Zytokinen auszulösen imstande waren. Für eine Reihe von Zytokinen ist gezeigt worden, dass ihre Applikation lokal oder systemisch im Mausmodell zu erstaunlichen Erfolgen führen kann (Lafreniere and Rosenberg 1985; Komschlies, Gregorio et al. 1994; Grzegorzewski, Komschlies et al. 1995; Wigginton, Komschlies et al. 1996). Leider ist die Übertragung dieser Konzepte in die Klinik bis auf wenige Ausnahmen ausgeblieben, da die eingesetzten Zytokine physiologisch in sehr geringen Konzentrationen und auf sehr geringe Distanzen wirken, und ihr systemischer Einsatz meist zu nicht tolerablen Nebenwirkungen führt (Rosenberg, Lotze et al. 1989).

Es liegt nahe, die lokale Konzentration der interessierenden Zytokine am Tumor dadurch zu erreichen, dass der Tumor mit einem Gen versehen wird, das das Zytokin konstitutiv exprimiert.

Zum Erreichen dieses Zieles müssen allerdings eine Reihe technischer Schwierigkeiten überwunden werden.

- Zunächst muß das Gen selektiv an die Tumorzellen gebracht werden (Zelltropismus). Ein unselektiver Gentransfer würde letztlich zur systemischen Expression des Genprodukts führen, und damit zu den erwähnten intolerablen Nebenwirkungen.
- Das Gen muß in die Zelle gebracht werden (Eintritt). DNA ist kein physiologisches Substrat für die Transportsysteme der Zellmembran und setzt als hochmolekulares Molekül dem physikalischen Eintritt erhebliche Schwierigkeiten entgegen.
- Das Gen muß, wenn es einmal innerhalb der Zelle ist, aus dem Aufnahmekompartiment, Zytosol, Endo- oder Lysosom in den Kern gebracht werden, um dort transkribiert zu werden (Kerntransport).

Diese Probleme des Gentransfers, Zelltropismus, Eintritt und Kerntransport, stellen jedes für sich erhebliche Hürden dar. Physiologisch schützen diese Hürden die Integrität des Genoms. Es gibt Systeme, die evolutionär an die Überwindung dieser Schwierigkeiten angepasst sind: Viren. Viren sind minimalistische Überträger von Information, oftmals kaum mehr als wenige Gene in einer spärlichen Verpackung. Viren zeichnen sich durch Zell- oder Organtropismus und sehr hohe Effizienz von Eintritt und Kerntransport aus. Genau wegen dieser Eigenschaften der Viren aber haben alle höheren Organismen sehr effiziente Mechanismen zu deren Bekämpfung entwickelt. Die meisten Ansätze zur Gentherapie gebrauchen als Gentransfermethode virale Systeme. Die Effizienz dieser Systeme bei einmaliger Anwendung und im nicht gegen das verwendete Virus immunisierten Patienten ist hoch. Bei wiederholter Anwendung oder bei prä-exponierten Patienten ist jedoch die Gefahr von Immunreaktionen gegen wiedererkannte Epitope oder gegen vom angeborenen Immunsystem ausgelösten Reaktionen hoch. Dies hat tragischerweise ein Todesfall in einer Gentherapiestudie zum Transfer von Carbamoyltransferase durch Adenoviren demonstriert (Lehrman 1999; Beardsley 2000)

1.1.3 Methoden des Gentransfers

Der Gentransfer in eine Zelle kann mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt werden (Tabelle 1.1). Grundsätzlich kann zwischen nicht-viralen und viralen

Methoden unterschieden werden. Diese Formen des Gentransfers führen entweder zu einer transienten Transfektion eines extrachromosomalen Gens, welches im Laufe der folgenden Zellteilungen verloren geht, da es nicht mit der chromosomalen DNA des Zellkerns repliziert wird, oder zu einer ungezielten, aber stabilen Integration in das Genom der Zelle. Ein integriertes Gen wird bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben.

1.1.3.1 Nicht-virale Gentransfermethoden

Es sind eine Vielfalt chemischer oder physikalischer Methoden zum Transfer von DNA in Zellen entwickelt worden. Darunter sind vom Gesichtspunkt der Anwendung vor allem die Transfektion mit Lipid-DNA-Komplexen, die Elektroporation sowie die direkte Injektion der DNA in den Zellkern, in Form der Mikroinjektion oder des sogenannten ballistischen Transfers, von Bedeutung. Dabei können die genannten Methoden mit Ausnahme der Mikroinjektion, wie virale Methoden, sowohl *in-vivo* (Sun, Burkholder et al. 1995; Hargest, Eldin et al. 1998; Jaroszeski, Gilbert et al. 1999; Kondoh, Motooka et al. 2000; Sugihara, Park et al. 2000) als auch auf Zellkulturzellen *in-vitro* angewendet werden (Enzymology 1993).

Gentransfermethode	Beschreibung
Calcium-Phosphat	+ wenig Aufwand - nur <i>ex vivo</i> , geringe Effizienz, wegen notwendiger Phagozytose nicht für alle Zellarten geeignet
Mikroinjektion	+ durch direkte Injektion in den Kern sehr hohe Transfektionseffizienz - nur <i>ex vivo</i> , nur max. 1000 Zellen/h können injiziert werden, deshalb für klinischen Einsatz ungeeignet
Liposomale Transfektion oder Lipofektion	+ auch <i>in vivo</i> anwendbar, kaum systemische Toxizität, <i>in vitro</i> hohe Effizienz - <i>in vivo</i> geringe Effizienz, keine Gewebsspezifität
DNA-Ligand-Komplexe	+ durch Auswahl geeigneter Rezeptorbindender Proteine wird Gewebsspezifität erreicht - geringe Effizienz, Partikel werden in Lysosomen zerstört
Elektroporation	+ hohe Effizienz (bei einigen Zelllinien) - Elektroporationsbedingungen müssen bei jeder Zellart neu ausgetestet werden

Tabelle 1.1 Nicht-virale Gentransfermethoden

Bei der Elektroporation werden von einem Kondensator ein oder mehrere elektrische Pulse hoher Spannung auf die zwischen den Kondensatorplatten befindliche Zellsuspension abgegeben. Diese Methode basiert auf Untersuchungen von Zimmermann, der zeigen konnte, dass ein elektrischer Pulse von kurzer Dauer und hoher Intensität zu einer vorübergehenden Veränderung der Zellmembran mit Ausbildung von Mikroporen führt (Zimmermann, Schulz et al. 1973). Dabei erfolgt ein Medieinstrom über die in den Zellen entstandenen Poren, durch den die in dem Medium gelöste DNA oder andere Makromoleküle in die Zelle gelangen sollen. Dabei ist die Überlebensrate der Zellen umgekehrt proportional zur Länge des Impulses und der Höhe der Spannung. Andererseits ist die Transfektionseffizienz bei einer zu niedrig gewählten Spannung nur sehr gering. Die Elektroporation ist besonders gut geeignet für schnell wachsende Zellen. Es müssen jedoch für jede Zellart optimale Elektroporationsbedingungen ausgetestet werden. Pro Elektroporation können bis zu $1 \cdot 10^7$ Zellen transfiziert werden. Die Transfektionseffizienz liegt je nach Zelltyp zwischen 10% und mehr als 90% (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982; Chu, Hayakawa et al. 1987; Keating and Toneguzzo 1990; Spencer 1993; Hamm, Krott et al. 2002).

Transfektion kann ebenso erreicht werden durch Komplexierung der DNA in kleine Partikel. Dafür sind eine Reihe kommerzielle Transfektionsreagenzien erhältlich, die auf polykationischen Lipiden, Peptiden oder synthetischen Polymeren basieren. Die Lipofektion beruht auf dem Prinzip der Bildung von kolloidalen Partikeln (Liposomen) in wässriger Lösung, die sich aus amphiphilen Substanzen (Phospholipiden) zusammensetzen. Die Liposomen können sowohl hydrophile Substanzen (z.B. DNA) in ihrer inneren wässrigen Phase als auch lipophile Substanzen (z.B. versch. Medikamente) in ihrer Lipid-Doppelschicht transportieren. Mit Hilfe der Lipofektion kann die Transfektionseffizienz um ein vielfaches gegenüber der Calciumphosphat-Technik gesteigert werden (Felgner, Gadek et al. 1987). Einige der liposomalen Transfektionsreagenzien werden durch Serumproteine gehemmt und können deshalb nur in serumfreien Zellkulturmedien angewendet werden und nicht in vivo. Ausserdem haben eine Reihe von Transfektionsreagenzien einen toxischen Effekt auf bestimmte Zelltypen und müssen vor der Anwendung intensiv getestet werden. Die Komplexierung der DNA mit Liposomen ist ein komplizierter Prozess und kann deshalb zu Problemen in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen. Trotzdem sind eine Reihe von klinischen Studien zur Behandlung von Krebs und

Mucoviszidose begonnen worden (Nabel, Nabel et al. 1993; Caplen, Alton et al. 1995).

Bei der Methode des direkten mechanischen Transfers in die Zelle kann entweder eine die zu transferierende Substanz enthaltende Lösung in die Zelle injiziert werden (Capecchi 1980; Gordon, Scangos et al. 1980; Graessmann, Graessmann et al. 1980; Graessmann, Wolf et al. 1980), oder die Substanz in fester Form, in Lösung oder an einen Träger adsorbiert auf die Zelle beschleunigt werden. Dabei wird die Zellwand durchschlagen und die Substanz dringt in die Zelle ein (sog. "ballistischer Transfer"), ohne dass die Zelle durch das Eindringen dieses Mikroprojektils untergeht (Daniell, Vivekananda et al. 1990; Yang, Burkholder et al. 1990; Klein, Arentzen et al. 1992; Daniell 1993; Sanford, Smith et al. 1993).

Bis auf die Mikroinjektion leiden diese Verfahren unter der zum Teil sehr geringen Effizienz des Transports in die Zelle. Im Falle der Mikroinjektion ist die Effizienz, ausgedrückt in Anteil der erfolgreich behandelten Zellen an der Gesamtzahl behandelter Zellen, zwar sehr groß, doch ist die Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig, so dass nur kleine Mengen von Zellen behandelt werden können.

Physikalische Gentransfermethoden zeigen per se keinen Zelltropismus. In Liposomen können durch Einführung geeigneter Peptide oder Kohlehydrate gewisse Tropismen erreicht werden (Yamamoto, Hayashi et al. 1995; Feero, Li et al. 1997; Carpenter and Minchin 1998), bei Elektroporation kann nur durch die Wahl des Ortes eine Selektion der transfizierten Zellen erreicht werden.

Eine Alternative zur Transfektion in-vivo kann die Behandlung der Zellen ex-vivo sein. In Anwendung auf das oben begonnene Beispiel des Gentransfers in Tumoren könnte das bedeuten, dass eine Metastase chirurgisch entnommen und außerhalb des Körpers transfiziert wird. Das veränderte Tumorgewebe wird dann in den Patienten zurückgegeben, wo es idealerweise eine Immunreaktion auslöst, die sich auf die als fremd erkannten Oberflächenepitope des Tumors richtet und damit auch im Körper verbliebene Metastasen eliminiert. Dies hat experimentell zu Erfolgen geführt. Sobol und Royston versuchten Colonkarzinompatienten mit autologen, bestrahlten Tumorzellen und Interleukin-2 transfizierten Fibroblasten zu immunisieren (Sobol, Royston et al. 1995). Die Gruppe um Stingl behandelte Melanompatienten mit autologen, transfizierten Melanomzellen (Stingl, Brocker et al. 1996). In der Gruppe von Schadendorf wurden Melanompatienten mit autologen

Melanomzellen, die durch Elektroporation mit einem Expressionsplasmid für Interleukin-7 transfiziert wurden, immunisiert (Finke, Trojaneck et al. 1997).

Während die Transfektion mit nicht-viralen Methoden ex-vivo das Tropismus-Problem löst und die Sicherheitsprobleme der Viren werden bei keiner der Methoden alle Zellen transfiziert.

In den meisten Fällen wird es erwünscht sein, nur die erfolgreich transfizierten Zellen zu isolieren. So werden bei herkömmlichen Verfahren die veränderten von den nicht veränderten Zellen durch Weiterzucht oder Selektion getrennt, was bei vielen Anwendungen die Brauchbarkeit der Methode einschränkt.

Ein Verfahren, das schonend und in kürzester Zeit die getroffenen Zellen von den nicht getroffenen Zellen abtrennt, wäre demnach für den Einsatz von Gentransfer-Verfahren in der Biotechnologie und Medizin von großem Vorteil.

Der ballistische Transfer ermöglicht prinzipiell eine unkomplizierte Art des Substanztransfers in Zellen. Die Methode wurde bisher vor allem bei Pflanzenzellen angewendet (Klein and Fitzpatrick-McElligott 1993), da für diese oftmals keine geeigneten Alternativen bereitstehen, doch auch bei Säugerzellen (Kolesnikov, Titomirov et al. 1988; Zelenin, Titomirov et al. 1989; Alimov, Kolesnikov et al. 1990; Johnston 1990; Burkholder, Decker et al. 1993; Johnston and Tang 1994; Christou 1995; Kolesnikov, Zelenina et al. 1995; Brayton, Bothma et al. 1997) und Prokaryonten (Smith, Harpending et al. 1992) war sie erfolgreich. Es lassen sich in einem Arbeitsschritt viele Tausende bis Millionen Zellen behandeln. Dabei wird die zu transferierende Substanz an Mikroprojektele adsorbiert, und diese werden durch eine durch Druckdifferenz herbeigeführte Gasstoßwelle auf die Zielzellen beschleunigt. Die zellulären Barrieren werden dabei durch die biologisch inerten Mikroprojektele (bestehend aus Gold oder Wolfram) aufgrund ihrer hohen kinetischen Energie überwunden. Die Partikel durchschlagen die Zellen und laden dabei die auf ihnen haftenden Substanzen in der Zelle ab. Beim ballistischen Transfer wird allerdings auch nur ein Teil der Zielzellen getroffen. Verdichtet man die auftreffende Garbe der Mikroprojektele derart, dass praktisch alle Zielzellen getroffen werden, ist mit einer sehr hohen Verlustrate an Zellen zu rechnen, da eine zu große Zahl von Treffern in ein und derselben Zelle zu deren Untergang führen wird. Ein Kompromiß zwischen hoher Trefferrate und hoher Überlebensrate der Zielzellen wird also immer dazu führen, dass ein Teil der Zielzellen unbehandelt bleibt.

Seit einiger Zeit sind in der Biochemie Arbeitsverfahren bekannt, die die Abtrennung bestimmter Anteile von Zell- oder Partikelgemischen dadurch ermöglichen, dass der abzutrennende Bestandteil über spezifische oder unspezifische Wechselwirkungen an in dem Gemisch befindliche ferromagnetische Partikel gebunden wird. Nach Anlegen eines Magnetfeldes werden die Partikel mit den an ihnen gebundenen abzutrennenden Bestandteilen im Magnetfeld festgehalten, während der Rest des Gemisches entfernt werden kann. Die abzutrennende Substanz kann nach Entfernen des angelegten Feldes und gegebenenfalls nach Abtrennung von den Magnetpartikeln weiterbehandelt werden. Die Bindung von Zellen an die Magnetpartikel wird dabei vor allem dadurch erreicht, dass biologische Moleküle an die Magnetpartikel kovalent gebunden werden, die ihrerseits starke spezifische Bindungen mit auf der Zelloberfläche gebundenen Molekülen eingehen. Auf diese Weise lassen sich z.B. verschiedene Leukozytenlinien nach ihrer unterschiedlichen Ausstattung mit Oberflächenmarkern isolieren.

Die Abtrennsysteme unterscheiden sich dabei vor allem in der Größe der verwendeten Partikel und damit auch in der Stärke des anzulegenden Feldes. Größere ferromagnetische Partikel ($>0.5 \mu\text{m}$) werden von einem verhältnismäßig schwachen, von einem einfachen Permanentmagneten erzeugten Feld über mehrere Millimeter hinweg angezogen und zurückgehalten. Diese Partikelgrößen bringen aber den Nachteil mit sich, dass die Partikel nach Entfernen des Magnetfeldes eine gewisse Restmagnetisierung behalten, da sie größer sind als die Weiss'schen Bezirke, die das ferromagnetische Verhalten der Partikel erzeugen. Gleichsinnig angeordnete Weiss'sche Bezirke verhalten sich wie kleine Permanentmagneten. Durch die dadurch entstehende gegenseitige Anziehung neigen die Partikel zur Aggregation und sedimentieren schneller.

Reduziert man die Größe der Partikel unter einen Schwellenwert, verhalten sich die Partikel superferromagnetisch, d.h. es bleibt keine Restmagnetisierung nach Entfernen des Feldes zurück. Durch die fehlende Restmagnetisierung und die geringere Partikelgröße halten sich die Partikel in kolloidaler Lösung, statt zu sedimentieren, und eignen sich dadurch besser für biotechnologische Trennverfahren. Allerdings muß das die Partikel zurückhaltende Magnetfeld stärker sein, um die Partikel aus dem Gemisch zu entfernen. Dieses gelingt in einem „Hochgradientenfeld“, durch das die Mischung hindurch geleitet wird (Miltenyi 1988; Miltenyi, Muller et al. 1990; Radbruch, Mechtold et al. 1994). Typischerweise gibt

ferromagnetisches Material Eisenionen ab, die viele biochemische Systeme stören. Dies kann dadurch verhindert werden, dass man die Partikel mit einer Polymerschicht umgibt (Miltényi 1988). Der Kern enthält dann Eisenoxid, das von einer Polysaccharidschicht umgeben ist. An diese Polymerschicht können auch Liganden für Membranproteine oder Antikörper gebunden sein (Brosterhus, Brings et al. 1999) Für Sortierung von positiv transfizierten Zellen wurde ein bicistronischer Vektor entwickelt. Dieser Vektor kodiert für ein Oberflächenprotein, gegen das ein Antikörper erhältlich ist, der an Magnetpartikel gebunden ist und für das Protein, das eigentlich exprimiert werden soll. Die Expression beider Gene sind durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, (Gaines and Wojchowski 1999)) miteinander verknüpft. Zellen, die das Oberflächenprotein exprimieren, können magnetisch sortiert werden. Diese Methode hat den großen Nachteil, dass ein zusätzliches Oberflächenprotein exprimiert werden muss, dass zu unerwünschten Immunreaktionen bei *ex vivo* Gentherapieansätzen führen kann. Auch der an das Oberflächenprotein gebundene Antikörper an der Zelloberfläche kann zu unerwünschten Nebenreaktionen führen.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, eine Gentransfer-Methode zu entwickeln, die für den klinischen Einsatz in der *ex-vivo* Gentherapie geeignet ist. Dabei sollte der ballistische Transfers als Wirkungsprinzip dienen. Das Design der im Handel erhältlichen Geräte, die bisher nur für die experimentelle Transfektion kleiner Anzahlen von Bakterien-, Pflanzen- oder Tierzellen verwendet wurden, ließ keine Transfektion größerer Zellmengen zu. Ein Ziel war deshalb, das Gerät so zu modifizieren, dass in einem Transfektionsschritt eine große Zellmenge ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen) behandelt werden kann.

Gerade bei der *ex-vivo* Gentherapie ist es sehr erstrebenswert, nur die Zellen dem Patienten zurückzugeben, die auch tatsächlich das gewünschte Protein transgen exprimieren. Ein weiteres Ziel war deshalb die das Transgen exprimierenden Zellen von den nicht exprimierenden Zellen abzutrennen. Dies sollte durch eine dem Transfektionsvorgang folgende magnetische Sortierung erfolgen. Drittens sollte gezeigt werden, dass es mit dem Verfahren möglich ist, mehrere Expressionskonstrukte in ein und dieselben Zellen zu bringen, in denen dann die auf den Expressionskonstrukten kodierten Gene gleichzeitig exprimiert werden.